SULLE MODIFICAZIONI

DEGLI

EPITELII GHIANDOLARI

DURANTE LA SECREZIONE

OSSERVAZIONI

DEL

Dott. V. GRANDIS

TORINO
CARLO CLAUSEN
Libraio della R. Accademia delle Scienze
1890

All'Illustre Prof. Foà

Omaggio dell'Autore

SULLE MODIFICAZIONI

DEGLI

EPITELII GHIANDOLARI

DURANTE LA SECREZIONE

OSSERVAZIONI

DEL

Dott. V. GRANDIS

TORINO

CARLO CLAUSEN

Libraio della R. Accademia delle Scienze

1890

Estr. dagli *Atti della R. Accademia delle Scienze di Torino*, vol. XXV
Adunanza dell' 8 Giugno 1890.

Torino, Stamperia Reale della Ditta G. B. Paravia e C.
4440 (50) 14-VII-90.

Numerosi tentativi furono fatti per seguire il succedersi di quelle modificazioni di struttura, che Heidenhain pel primo dimostrò avvenire nella maggior parte delle ghiandole, durante la secrezione. Già fin dal 1840 Ascherson (1) osservando le ghiandole della pelle nelle rane aveva notato dei movimenti di contrazione, che descrisse accuratamente. Però il suo lavoro non fu tenuto in alcun conto se non dopo che Engelmann (2) riprese a studiare profondamente lo stesso argomento. Quasi contemporaneamente Kühne e Lea riuscirono ad osservare per lungo tempo il pancreas dei conigli, ed a studiare l'azione di diverse condizioni fisiologiche. Più tardi Langley (3) confermò coll'esame diretto delle ghiandole sierose i risultati ottenuti da Heidenhain sulle ghiandole mucose.

Ultimamente Drasch (4) osservò che le ghiandole della pelle delle rane durante la funzione non modificano la loro struttura microscopica, ma modificano notevolmente la loro forma.

La grande delicatezza degli epiteli, e la difficoltà della ricerca non permisero che queste osservazioni potessero venire estese a tutte le ghiandole. Rimane ancora irresoluta la questione se anche il rene si comporti nello stesso modo.

Dietro consiglio del prof. Mosso ho intrapreso due anni or sono lo studio di questa importante questione.

---

(1) Vedi il lavoro di Engelmann.
(2) Engelmann, *Pflüger's Archiv*, vol. V, pag. 498, vol. VI, pag. 97.
(3) Langley, *Journal of the Physiology*, vol. II, pag. 260.
(4) Drasch, *Archiv f. Anat. u. Physiol. Phisiolog. Abth.*, 1889, pag. 96.

In seguito a molti tentativi infruttuosi la mia attenzione fu rivolta agli organi orinari degli insetti. È oramai ammesso da tutti i zoologi, specialmente per i risultati di studi embriologici rigorosi, che i canalicoli malpighiani rappresentano il rene dei vertebrati. La grande semplicità di struttura di questi organi mi parve renderli molto adatti ad essere sottoposti all'osservazione diretta. A ciò si deve aggiungere la considerevole resistenza vitale di questi invertebrati, il modo in cui si compie la respirazione e la circolazione, tutte condizioni le quali fanno sì che essi debbano essere preferiti per lo studio di organi molto delicati.

Estesi le mie osservazioni a rappresentanti di varie famiglie di insetti quali la *Locusta viridissima*, vari lepidotteri, la *Melolonta*, e l'*Hydrophilus*, e dovetti convincermi che quest'ultima è la specie più adatta per sì fatte osservazioni, tanto per la disposizione anatomica dei tubi malpighiani, quanto specialmente per la grandezza enorme dei loro epiteli, così che con piccoli ingrandimenti si possono scorgere molti dettagli della struttura cellulare.

Onde poter fare le mie osservazioni nelle condizioni più prossime possibili alle normali preparavo l'animale nel modo che descriverò brevemente.

Dopo aver amputate le estremità ed esportate le elitre e le ali ad un *Hydrophilus*, aprivo colle forbici la parte dorsale del segmento addominale, secondo una linea che coincideva ad un dipresso coll'asse antero-posteriore del corpo. Quindi con due incisioni laterali perpendicolari alla prima rovesciavo all'infuori il tegumento e lo esportavo con un colpo di forbici. Nel fare queste incisioni è facilissimo ledere due enormi sacchi aerei che stanno nella parte anteriore dell' addome, è quindi necessario andar molto cauti quando si desideri che l'animale duri per molto tempo in vita. Così preparato lo fissavo sopra una tavoletta di sughero, come quelle che servono per osservare la circolazione nelle rane. Nella tavoletta era stata praticata un'apertura circolare del diametro di un centimetro circa, la quale venne convertita in una pozzetta a fondo trasparente attaccando con ceralacca un vetro porta-oggetti sulla superficie inferiore della lamina in modo da chiudere l'apertura praticata nel sughero.

L'*Hydrophilus* veniva fissato sulla tavoletta in posizione di fianco con due spilli di cui l'uno infisso nel torace e l'altro all'estremità anale del corpo, in modo che l'addome si trovasse in corrispondenza della pozzetta. Questa veniva riempita con la linfa

perduta dall'animale, diluita con cloruro di sodio in soluzione al 0,75 $^0/_0$. Dentro vi facevo cadere la matassa intestinale e poi distendevo con precauzione l'intestino sui bordi della pozzetta fissandovelo con degli spilli.

In queste manipolazioni procuravo di fare movimenti delicatissimi in modo da non rompere le trachee, le quali partendo dai sacchi aerei di cui accennai sopra si distribuiscono a tutti gli organi dell'addome. Ebbi più volte occasione di convincermi che questa è una condizione indispensabile perchè si possa protrarre lungamente l'osservazione, senza che avvengano alterazioni dovute alla morte delle cellule.

Una delle ragioni per cui l'*Hydrophilus* è più adatto degli altri insetti a questo genere di osservazioni sta appunto nel fatto, che esso, riempiendo d'aria i suoi sacchi aerei, può reggere lungamente senza respirare, atto che è reso difficile dall'esportazione delle pareti dell'addome.

Procedendo con queste cautele ho fatto le mie osservazioni sulla funzione di questi organi. Di esse riferirò in seguito.

Prima credo necessario di fare un breve cenno della struttura dei tubi malpighiani dell'*Hydrophilus*. Così si potranno comprendere più facilmente le osservazioni che descriverò in seguito, poichè ho notato alcune particolarità, le quali si allontanano alquanto dallo schema generale di questi organi, come viene descritto da Schindler (1) nei coleotteri.

Struttura dei canalicoli malpighiani dell'Hydrophilus piceus.

Feci quasi tutte le mie osservazioni sopra pezzi freschi senza sottoporli all'azione di alcun agente indurente o fissatore. Anzi la massima parte delle osservazioni sulla struttura fu fatta sull'animale vivo. Ho deciso di seguire questo metodo, siccome quello che mi permetteva di poter più facilmente apprezzare i mutamenti dell'organo in funzione. Sono ricorso all'induramento ed ai soliti reagenti microscopici solo quando doveva mettere meglio

(1) ZEITSCHRIFT f., *Wessenschaft Zoolog. Kölliker u. Siebold*, vol. XXX, pag. 587.

in evidenza qualche particolarità, di cui non fosse possibile farmi un concetto abbastanza chiaro in altro modo.

Salvo nei casi che indicherò in modo speciale, s'intenderà che tutte le osservazioni furono fatte coll'obiettivo 3 di Leitz e coll'oculare 3.

Nell'*Hydrophilus* i tubi malpighiani sono in numero di quattro variamente attorcigliati fra di loro, avvolgono tutto l'intestino risalendo fino in corrispondenza dello stomaco, dove fanno un'ansa, ridiscendono in basso e si gettano nell'intestino retto in corrispondenza della cloaca. In essi si distingue una parete di sostegno e le cellule epiteliari. Sopra di essi si distribuiscono numerosissime le trachee divise in ramificazioni molto sottili.

La parete di sostegno veduta in sezione ottica appare fornita di un doppio contorno, ed in essa si distingue una parte ialina apparentemente amorfa, nella quale si vedono qua e là disseminati dei grossi elementi ovolari, del diametro di 40-50 μ. Come si vede nella fig. 1ª essi contengono grosse granulazioni splendenti, immerse in una sostanza finamente granulosa. Queste granulazioni sono disposte ad intervalli regolari e guardate con una lente ad immersione, $^1/_{12}$ Leitz, dimostrano avere una struttura molto complicata. In ciascuna di esse si distingue una parte periferica costituita da una linea colorabile coi colori nucleari, la quale fa l'impressione di una parete limitante il granulo. Nell'interno dello spazio limitato da questa linea si osserva una sostanza amorfa incolora, nella quale stanno alla loro volta immersi altri granuli colorati piccoli in numero di due a tre variamente disposti.

Dal modo di comportarsi della parete di questi corpi ovali e delle loro granulazioni rispetto ai colori di carmino e di anilina credo si debbano considerare come i nuclei di grosse cellule fatte da protoplasma apparentemente amorfo.

Nello spessore della parete del canalicolo si vede una rete molto fitta e di aspetto più rinfrangente della sostanza ambiente, costituita da filamenti incrociati in vario modo. Nel punto d'incontro di più filamenti si vede generalmente un piccolo corpicciuolo ovolare o circolare contenente piccole granulazioni splendenti. Questo corpicciuolo e le sue granulazioni si colorano rapidamente in azzurro col bleu di metile ed in verde col verde jodio, in rosso col carmino, presentano cioè tutti i caratteri di un vero nucleo cellulare. Tanto la rete quanto i suoi nuclei sono

difficilmente visibili nei tubi, i quali hanno cellule epiteliari molto ricche in sostanza colorante; ma si vedono molto bene in quei tubi dove le cellule sono perfettamente incolore e trasparenti. Per vedere questi particolari più distintamente nella prima varietà di tubi è necessario alterare alquanto il rapporto fra le varie parti del canalicolo, e fare in modo che alcune cellule epiteliari si stacchino. Nel campo chiaro che ne risulta spiccano molto bene i filamenti della rete per dei sottili bordi scuri dovuti alla loro rinfrangenza più forte. Ho notato che si può rendere molto evidente questa reticella lasciandola per alcun tempo immersa in una soluzione al 2 °/$_c$ di bleu di metile, dove i filamenti prendono una leggera colorazione azurra, la quale permette di distinguerli dalla sostanza circostante.

Cercai vari modi onde determinare la natura di questa rete, se cioè fosse nervosa od elastica, di ciò tratterò più diffusamente in altra Nota, per ora dirò solo che col metodo di Golgi al cloruro d'oro si colora una rete disposta in senso trasversale al canalicolo, la quale ha numerosissime anastomosi e finisce in filamenti sottilissimi, la cui terminazione si sottrae ai più forti ingrandimenti. Per contro non ottenni alcuna colorazione col metodo di C. Martinotti, (1) il quale mette in evidenza le fibre elastiche. Dopo sottoposti i tubi alla digestione peptica non si riesce più a veder traccia della rete nei tubi a cellule epiteliari colorate, mentre nei tubi a cellule incolore si osserva una rete molto fitta costituita da grossi tronchi disposti trasversalmente, obliquamente e longitudinalmente al canalicolo.

Qualche volta si incontrano dei tubi dove non è dato scorgere traccia di struttura all'infuori della rete ultima descritta, la quale assume un notevole grado di sviluppo. Nella parete non ho mai riscontrato alcuna fibra muscolare nè liscia nè striata.

Il componente più importante dei tubi malpighiani è costituito dalle cellule epiteliari. Nell'*Hydrophilus* esse hanno generalmente forma poliedrica o rotondeggiante con un grosso nucleo ovolare centrale. Le cellule hanno un diametro di 110 μ. mentre il nucleo misura 30 μ. Accade spesso di vedere delle cellule con due nuclei, i quali sono avvicinati in modo da rappresentare una cifra 8 con strozzatura più o meno marcata. Il protoplasma

---

(1) C. Martinotti, *Della reazione delle fibre elastiche*, Torino, Annali di freniatria, vol. I.

cellulare presenta delle particolarità degne di nota. Esso può venir diviso in tre zone, distinte fra loro per caratteri ben definiti. Osservate ad un piccolo ingrandimento le cellule in generale appaiono separate fra loro da uno spazio chiaro di dimensioni variabili da 10 a 20 μ. Con un esame molto attento si riesce qualche volta, anche con piccoli ingrandimenti, a vedere che esse sono realmente una a contatto dell'altra e che nel punto di contatto sono divise fra loro soltanto per una sottilissima linea. L'intervallo chiaro è dato dalla grande trasparenza propria della parte marginale del protoplasma. Questa zona periferica è limitata dal resto del corpo cellulare per una linea molto più marcata di quella esistente fra due cellule contigue.

Ho riprodotto nella Fig. 2ª una cellula epiteliare veduta ad un forte ingrandimento, (8* Koritska). Quando si esaminino dei pezzi freschi e senza far loro subire maltrattamenti, si vede che in corrispondenza della zona trasparente il protoplasma presenta una delicatissima striatura, cosichè sembra formato da fibrille sottilissime, giustapposte, dirette secondo la direzione dei raggi del corpo cellulare.

Leydig (1) aveva già riscontrato e descritto questo stesso fatto nelle cellule dei tubi malpighiani della *Cetonia aurata* e del *Bombyx neustria*, Ogni fibrilla porta, nel punto in cui si unisce al resto del protoplasma, un granulo leggermente più grande e più rifrangente di quelli che costituiscono il corpo protoplasmatico. La disposizione regolare di questi granuli, uno accanto all'altro tutto all'ingiro della cellula, fa sì che vengono a costituire una linea netta scura, la quale vista a piccolo ingrandimento sembra segnare la periferia della cellula, non potendosi avvertire la sottile striatura nella zona trasparente testè descritta.

All'interno di questo strato si trova una zona di dimensioni variabili, la quale costituisce la più grande parte del corpo cellulare e limita un' area circolare centrale di aspetto chiaro. Essa è fornita di una struttura molto complicata. La massa generale è fatta da fini granuli e va divisa in due parti, esterna ed interna.

Nella parte esterna, tra i granuli si vedono disseminate delle

---

(1) LEYDIG, *Untersuchungen zur Anatomie und Histologie der Thiere*, Bonn., 1883, pag. 5?.

scarse granulazioni più grandi, fortemente rifrangenti, incolore a riflessi giallo-verdastri. In oltre non di rado questo strato contiene delle goccie regolarmente sferiche, fortemente rifrangenti di color giallognolo, chiamate dagli autori col nome di sfere di secreto. La parte interna contiene dei granuli grossi di colore giallo-bruno a forma allungata, essi sono in quantità variabile, per lo più fittamente addensati l'uno contro l'altro. L'accumulo di questi granuli dà al protoplasma un color giallo più o meno intenso, secondo il loro grado di addensamento, il quale, quando è notevole, impartisce un colore bruno così carico da coprire tutti gli altri particolari. Osservando a forte ingrandimento (8* Koritska $^{1}/_{12}$. Leitz. imm. omog.) potei constatare, come aveva già descritto Leydig, che i granuli gialli sono costantemente formati da cristallini prismatici a contorni ben limitati. Raramente avviene d'incontrare alcuna sfera più o meno grande di una sostanza gialla identica per l'aspetto fisico a quella di cui sono composti i cristalli. Osservati alla luce polarizzata, tanto i cristalli quanto le sfere, si mostrano birifrangenti, e quando i prismi sono incrociati spiccano sul fondo oscuro come linee splendenti d'un bel colore giallo-dorato. Immergendo i tubi malpighiani in alcool scompare il loro color giallo e con esso i cristalli contenuti nelle cellule, mentre l'alcool prende un color giallo con una bella fluorescenza verde in tutto identica a quella della fluoresceina. Ho già intrapreso una serie di ricerche per determinare la natura di questa sostanza. Riferirò dettagliatamente in una prossima Nota i risultati ottenuti.

La terza zona è costituita da un'area centrale chiara.

Negli organi freschi non si riesce a vedere alcuna struttura dei nuclei; nei pezzi induriti in alcool e colorati con carmino o con saffranina, si vede che il nucleo, il quale corrisponde all'area chiara centrale della cellula vivente, è formato da grosse granulazioni sferiche disposte regolarmente una accanto all'altra. Queste prendono una colorazione violetto sporco col carmino alluminato e roseo pallido colla saffranina, e fra esse spiccano talora due, talora tre corpicciuoli sferici più grandi fortemente colorati.

Nei pezzi stati in alcool il protoplasma si mostra formato da grossi granuli di color grigiastro.

Sopra i canalicoli malpighiani si distribuisce una quantità molto grande di trachee le quali conservano i loro caratteri fin-

tanto che il loro diametro non è inferiore ad 1–2 μ. Allora terminano con un lungo ciuffo a mo'di pennello fatto da sottili canalicoli perdentesi nell'interno della cellula. I canalicoli terminali sono così sottili e formano una rete così fitta che se ne possono contare parecchie decine sulla superficie di una sola cellula. Esse presentano di particolare che non si anastomizzano mai fra di loro. Per ora non farò alcun cenno dei nervi, riserbandomi di ritornarci sopra in un apposito lavoro.

Azioni dei colori d'anilina sopra le cellule.

Tutte le particolarità che ho descritto fin ora si possono anche osservare staccando rapidamente un pezzetto di tubo malpighiano ed esaminandolo in cloruro sodico al 0,75 % oppure nel siero stesso dell'*Hydrophilus* o in una miscela di siero o cloruro sodico al 0,75 %. Se in un preparato così fatto, si fa arrivare una goccia di una soluzione di verde jodio al 2 % in una soluzione fisiologica di cloruro sodico, si osserva comparire immediatamente una colorazione verde pallida nelle fibrille e nei nuclei della rete che si trova nella parete dei tubi. Contemporaneamente si colorano pure in verde quei grossi nuclei della parete, i quali hanno granulazioni splendenti, mentre le cellule epiteliari si comportano diversamente. Come si vede dalle fig. 3 e 4, si deve distinguere il modo di comportarsi del nucleo da quello del protoplasma. Nelle cellule situate alla estremità del moncone, le quali hanno subìto il trauma della sezione, il nucleo assorbe rapidamente il colore tingendosi in verde smeraldo, mentre nelle altre cellule il nucleo si mantiene incoloro anche dopo parecchie ore. Dopo un tempo variabile da 5′ a 15′ minuti il protoplasma delle cellule, il cui nucleo si era già colorato in verde, incomincia a prendere una colorazione grigiastra, la quale va man mano diventando d'un grigio azzurro, e persiste in questo stato, mentre si accentua sempre più la colorazione verde del nucleo, se continua l'azione della sostanza colorante. Il protoplasma di quelle cellule, di cui il nucleo si è mantenuto incoloro, dopo un tempo variabile da 30′ a 40′ minuti incomincia a colorarsi in violetto intenso alla periferia. La zona colorata si allarga sempre più finchè si estende a tutta la cellula, all'infuori di uno spazio

chiaro centrale, limitato da contorni sfumati, il quale può talora essere duplice e corrisponde perfettamente all'area coloratasi in verde nelle cellule dell'estremità del moncone. L'intensità della colorazione del protoplasma diventa così grande da eguagliare quella dello stesso colore nello spettro solare. In questo stadio le cellule si conservano per parecchie ore ed anche per tutto un giorno, quindi il nucleo incomincia a colorarsi in verde, e la colorazione violetta del protoplasma passa poco a poco in un colore grigio azzurrognolo, uguale a quello assunto rapidamente dalle cellule dell'estremità del moncone.

Sugli organi in sito avviene ad un dipresso la stessa cosa. Aggiungendo alcune goccie della stessa soluzione di verde jodio nella pozzetta sulla quale stanno distesi i canalicoli malpighiani di recente preparati si vede che il protoplasma cellulare incomincia a prendere una tinta violacea, la quale va sempre più accentuandosi. A differenza di quanto si osserva nel canalicolo staccato il colore violetto non cede il posto alla colorazione grigia azzurrastra, ma dopo un lasso di tempo, che varia secondo le condizioni di temperatura e di vivacità dell'*Hydrophilus*, scompare senza lasciar traccia. In queste condizioni non accade mai di vedere il nucleo a colorarsi nè in verde nè in altro colore. Ciò avviene però quasi istantaneamente in alcuni punti quando con una pinzetta si stringa il canalicolo in modo da alterare più o meno profondamente le cellule.

Quando la colorazione violetta è scomparsa, la si può far ricomparire aggiungendo del nuovo verde jodio che viene alla sua volta eliminato. Dopo tre giorni per lo più le cellule prendono un aspetto torbido fortemente granuloso per granuli meno rifrangenti di quelli normali, nel centro non si scorge più spazio chiaro nè alcun altro dettaglio cellulare. Aggiungendo una goccia di soluzione di verde jodio al preparato, in cui i canalicoli sono ridotti in questo stato, il nucleo si colora immediatamente in verde ed il protoplasma in grigio azzurro. Per acquistare maggior certezza che questa differenza di reazione delle cellule col verde jodio dipende dalle condizioni di vita della cellula, prima di sottoporre un *Hydrophilus* all'osservazione esportai un tratto di tubo malpighiano, che divisi in due parti. Immersi una parte in acqua distillata e ve la lasciai per 5 minuti dopo i quali la trattai con verde jodio e la esaminai rapidamente. Tutti i nuclei erano colorati in verde e dopo alcuni minuti si colorò in

grigio il protoplasma. Lasciai l'altra parte a bagno in una soluzione fisiologica di cloruro di sodio al 0,75 % per un'ora, dopo la quale, trattato il pezzo con verde jodio, vidi che i nuclei si erano mantenuti incolori e che il protoplasma prese una tinta violetta. I tubi che erano rimasti attaccati all'animale si mantennero per tre giorni col nucleo non colorabile. Si trattava ora di determinare se il cambiamento di colore dipendesse da una differente reazione chimica del protoplasma e del nucleo allo stato normale e dopo morte o da qualche processo speciale che avesse luogo in queste parti.

Ho provato ad acidificare leggermente la soluzione di verde jodio ed immediatamente la colorazione verde-cupa cessò per far luogo ad un color verde-erba chiaro. Alcalinizzando il verde jodio con alcune goccie di una soluzione diluita di idrato di potassio compare un' intensa colorazione violetta la quale è distrutta da un eccesso del reattivo. Trattando la soluzione di verde jodio con polvere di zinco si scolorò per cui dovetti conchiudere che la colorazione violetta acquistata dalle cellule è dovuta alla loro reazione alcalina e non a processi di riduzione.

Provai a sostituire il verde jodio col verde di metile il quale, come fu dimostrato dal prof. Mosso (1), si comporta in modo analogo colle cellule viventi. Con questo reattivo in pochi minuti vengono colorate in verde tutte le cellule e riuscii solo a scorgere delle differenze di tonalità poco marcate tra le cellule normali, e quelle che hanno subìto un'alterazione qualunque.

Quando si fa agire il *Licthgrün* tutte le cellule si colorano diffusamente in verde smeraldo. Sotto l'azione del liquido Erlich-Biondi i nuclei delle cellule epiteliari si colorano in verde e se il liquido agisce per molto tempo il protoplasma si colora in aranciato.

Il *bleu* di metilene si comporta in un modo tutto particolare colle cellule epiteliari, quindi merita di essere trattato più diffusamente.

Injettai nell'addome di un *Hydrophilus* un centimetro cubico di una soluzione di *bleu* di metilene all'uno per cento.

Dopo due ore aprii l'addome ed esportai un pezzetto di tubo malpighiano che osservai in cloruro di sodio al 0,75 % serven-

---

(1) A. Mosso, *Rendiconti della R. Accademia dei Lincei*, vol. IV, pag. 419.

domi di forti ingrandimenti. Come si vede dalla fig. 5 le cellule epiteliari si mostrano del tutto normali, però nella zona mediana del protoplasma si vede un buon numero di granuli sferici colorati in azzurro ed alcuni colorati in rosso porpora o in violetto. Quando la preparazione è fatta da un po' di tempo aumenta il numero dei granuli violetti e diminuisce quello degli azzurri. Con delle esperienze di confronto potei assicurarmi che i granuli coloratisi col *bleu* di metilene corrispondono alle granulazioni più grosse e più rifrangenti, la quali si trovano nella zona mediana del protoplasma.

Esaminate con un obiettivo ad immersione $^1/_{12}$ Leitz queste granulazioni colorate non si presentano tutte colla stessa struttura. Le più piccole appaiono come semplici sfere e queste sono quasi tutte colorate in azzurro. Le più grandi hanno talora forma irregolare e sono fornite di una struttura più complicata. In esse si distingue una parte periferica rappresentata da una sottile linea colorata più intensamente, la quale limita uno spazio più chiaro, amorfo, dentro cui sono comprese due o tre granulazioni colorate colla stessa intensità della linea periferica. Sono specialmente queste le granulazioni che prendono un colore rosso porpora.

Due interpretazioni possono darsi a questo fatto: cioè che si tratti qui di vere terminazioni nervose le quali secondo Erlich (1) hanno la proprietà di fissare il *bleu* di metilene injettato nell'organismo quando si trovino fornite di reazione alcalina e siano saturate di ossigeno; oppure che siano granulazioni incaricate di una speciale funzione nel lavorìo chimico della cellula. Erlich nel suo lavoro sopra il bisogno che l'organismo ha dell'ossigeno (2) emette l'ipotesi che nelle cellule ghiandolari il tramite per cui vengono eliminate le sostanze sia il paraplasma di Kupffer mentre che il protoplasma propriamente detto rappresenti solo la parte vivente della cellula.

Io non credo di poter per ora decidere quale delle due interpretazioni sia qui da applicarsi. Volendo avere un numero maggiore di dati ho cercato come queste granulazioni si comportassero con altre sostanze e trovai, che, trattando i canalicoli

---

(1) Erlich, *Deutsche Medicinishe Wochenschrift*, 1886, N. 4.

(2) Erlich, *Das Sauerstoff Bedürfniss des Organismus*, Berlin, 1885, pag. 151.

secondo il metodo di Golgi per mettere in evidenza le terminazioni nervose col cloruro d'oro e di sodio, quelle stesse granulazioni si colorano in nero. Trattando le cellule con una soluzione di acido osmico all'1 $^0/_0$ si ha un annerimento più forte nelle granulazioni che nelle parti circostanti.

L'ematossilina le colora fortemente in violetto cupo.

Osservazioni sui tubi malpighiani allo stato normale.

Quando si osservano i tubi malpighiani di un *Hydrophilus* preparati nel modo e colle cautele sopra descritte, adoprando un ingrandimento di 100 diametri (3 Leitz ocul. 3) l'attenzione viene principalmente attirata dalla notevole differenza esistente non solo fra due tubi vicini ma anche fra due parti dello stesso tubo. Questa differenza consiste specialmente nel diametro delle cellule e del tubo, nella forma dei contorni dei tubi e delle cellule, nell'intensità e nella distribuzione della sostanza colorante, nello spessore della parete del tubo stesso e nella larghezza degli spazi intercellulari. Fu necessaria una serie numerosa di osservazioni prolungate per lungo tempo onde riuscire a classificare queste differenze. Esse si possono raggruppare in due ordini: differenze dipendenti dalla diversa forma della parete del canalicolo, e differenze dipendenti dalla forma delle cellule. Combinandosi in diverso grado questi due fattori possono dare ai canalicoli degli aspetti assai differenti.

Io mi limiterò a descrivere l'aspetto preso negli strati estremi di ciascuno dei due gruppi. Considerando il canalicolo nel suo insieme, astrazion fatta dalle cellule epiteliari, si vede che alcuni hanno un diametro di $180 - 200\ \mu$ $^0/_0$ mentre gli altri misurano solo $100 - 110\ \mu$ $^0/_0$. In questi ultimi la parete ha uno spessore di $1 - 2\ \mu$ $^0/_0$ mentre nei primi è ridotto ad una sottile linea.

I canalicoli più piccoli hanno contorno irregolare frastagliato da sporgenze ed avallamenti, la parete è fortemente rifrangente limitata da un doppio contorno netto e scuro. Nello spessore della parete vista in sezione ottica si vedono dei granuli più rifrangenti. In questo stadio la parete ha una trasparenza alquanto minore.

Nei canalicoli che hanno il diametro maggiore la parete è

molto trasparente, e limitata da un contorno morbido e regolare con andamento per lo più rettilineo, o di curva a grande raggio. Il suo spessore è molto minore, i suoi contorni sono segnati da linee sottili ed indecise, nel suo spessore si vedono dei sottili filamenti variamente intrecciati a formare una rete più rifrangente della sostanza che li circonda. Non esiste alcuna regola per la distribuzione di queste due forme di canalicoli. In generale non esiste un passaggio brusco dall'una all'altra forma, ma si incontrano tra questi due numerosi stadi intermedi, nei quali predominano i caratteri dell'uno o dell'altro stadio.

Per quanto riguarda le cellule si hanno delle differenze anche più marcate. In alcuni tubi esse si presentano con l'aspetto tipico descritto nel primo paragrafo, esse sono assai trasparenti a contorni poligonali. I loro margini striati si toccano per tutta la loro estensione, non lasciando spazio intercellulare. In questo stato i granuli contenuti nell' interno dei tubuli si vedono come attraverso ad un velo molto trasparente. Le cellule misurano 100 — 110 μ % hanno un' area nucleare molto ampia, un aspetto più pallido e sono molto trasparenti.

A questa si contrappone un'altra forma. In essa le cellule sono rotonde od ovali, hanno rifrangenza molto considerevole con riflessi verdognoli. Le cellule non hanno fra loro che pochissimi punti di contatto anzi per lo più sono separate l'una dall'altra da larghi spazi intercellulari. È sparita la zona esterna frangiata, le cellule hanno acquistato uno spessore maggiore, e guardando attentamente, si vede che il contorno cellulare non è una linea continua, ma ha delle sporgenze ed avallamenti paragonabili alle rugosità della buccia degli aranci. Le rugosità sono determinate da granuli sporgenti sulla superficie della cellula.

L'area nucleare è molto più stretta, tutta la cellula ha colore più scuro, i granuli protoplasmatici sono più addensati. In questa forma le cellule misurano generalmente 50-60 μ. Tra queste forme estreme si notano qui pure numerose forme di passaggio. S'intende che queste differenze riguardano solo le cellule epiteliari; non ho notato alcuna differenza in quei nuclei ovali a grosse granulazioni regolari che stanno nello stesso piano della parete del canalicolo.

Le due forme descritte per la parete si possono trovare associate indifferentemente con ciascuna delle forme descritte per le cellule. Da questo ne deriva una serie numerosa di aspetti

diversi secondo che nelle combinazioni predomina l'una o l'altra delle quattro forme. Quando nel canalicolo ristretto si hanno cellule nella forma a dimensioni maggiori ne viene, che le cellule trovandosi fortemente compresse l'una contro l'altra sono obligate ad assumere delle forme irregolarissime, e premendo contro la parete del canalicolo dànno luogo a delle sporgenze e a degli avallamenti, i quali concorrono a renderlo più irregolare. Viceversa, quando si hanno delle cellule nella forma piccola in canalicoli larghi, si hanno dei larghi spazi intercellulari, dai quali si può vedere molto distintamente nell'interno del canalicolo. Nei casi in cui le cellule piccole si trovano in canalicoli piccoli, esse appaiono fortemente rotondeggianti di colorazione molto scura, per cui si vede assai male nell'interno del canalicolo stesso.

Se la preparazione fu eseguita con tutte le cautele indicate non si tarda a scorgere la ragione di questo differente aspetto delle parti di uno stesso organo. Prolungando l'osservazione, dopo i primi dieci minuti, quando è passata l'azione del trauma si vede generalmente che i canalicoli eseguiscono dei movimenti con forza e ritmo variabile.

Cercherò di descrivere il più chiaramente che mi sarà possibile tutte le modificazioni che si possono seguire coll'occhio, e per rendermi più facile il còmpito dividerò la descrizione in due parti; modificazione della forma e modificazione dell'aspetto. Riguardo alla forma si osserva che questi movimenti possono raggiungere il numero di 8-10 in un minuto, ma si può anche avere una sola contrazione ogni uno o due minuti e talora anche meno. Questi movimenti si possono paragonare a contrazioni per cui tanto il tubulo quanto i singoli elementi di cui è composto diminuiscono di volume. Non raramente però accade di vedere che una sola o poche cellule facciano questi movimenti mentre le altre parti si conservano inalterate. In tali casi i movimenti sono molto più deboli. Durante la contrazione i canalicoli passano per tutti gli stadi descritti sopra. Ho riprodotto colla camera lucida nella Fig. 6 un'ansa di tubo malpighiano in cui la metà destra fu disegnata allo stato di contrazione e la sinistra allo stato di massima dilatazione.

Non ho mai potuto determinare quale fosse lo stadio di riposo perchè il movimento si può arrestare mentre il canalicolo si trova in uno qualunque degli stadi sopra detti, e rimaner

fisso lungamente in tale posizione. Perciò differenzierò gli stadi coll'epiteto di dilatato, medio e contratto. Da quanto ho detto sopra si deduce che i cambiamenti di forma delle cellule possono essere indipendenti da quelli della parete, però questi hanno grande influenza sui primi, per cui generalmente avviene che nello stadio dilatato le cellule hanno l'aspetto descritto nel primo paragrafo. Nello stadio intermedio la parete del canalicolo è alquanto più marcata ed ha uno spessore un po' maggiore sebbene sia sempre limitata da linee molto sottili e pallide ed abbia dei contorni regolari. Le cellule prendono un colore giallo più carico, si fanno più spesse e l'area nucleare diventa alquanto più piccola. Il cambiamento di colore è dovuto all'avvicinarsi dei cristallini gialli sopra descritti. Delle tre zone in cui si distingue il corpo protoplasmatico, la più esterna è quella che si riduce maggiormente, tutta la cellula acquista maggior rifrangenza perdendo in trasparenza, fatto che rende meno chiari tutti i dettagli.

Nello stadio contratto il color giallo-bruno si estende a tutto il corpo cellulare e scompare completamente l'area nucleare, tutta la cellula può prendere delle dimensioni minori di quelle che ha il nucleo nello stato dilatato. Le cellule sono diventate fortemente convesse, sono compresse le une contro le altre, si mostrano completamente prive della zona esterna frangiata, ed hanno i granuli cristallini talmente avvicinati che non riesce possibile alcuna osservazione nell'interno del tubo.

Spesso queste modificazioni si succedono così rapidamente che riesce impossibile riprodurne le fasi col disegno.

Non esiste regola fissa riguardo al modo di contrarsi dei canalicoli, ora il movimento si propaga in modo peristaltico, altre volte invece la contrazione è contemporanea in tutto un lungo tratto di canalicolo. Mentre un tratto di tubo rimane immobile, la sua continuazione a destra si dilata, e quella di sinistra può anche restringersi.

È pure molto variabile il ciclo del movimento il quale talora consiste in una semplice contrazione seguìta da una successiva dilatazione, o da una pausa, altre volte avviene il fatto opposto. Altre volte ancora si direbbe che la dilatazione avviene per elasticità tendente a ristabilire l'equilibrio turbato da una contrazione avvenuta; e viceversa alcune volte, tenuto conto della rapidità e della violenza del movimento, pare attiva la dilatazione e passivo il restringimento. Quest'ultimo caso avviene spe-

cialmente, quando il canalicolo si riposa nello stato intermedio, ed il movimento avviene nel senso della dilatazione. Credo inutile soggiungere che mi sono ripetutamente assicurato in tutti i modi possibili che questo movimento non fosse trasmesso, cosa la quale viene esclusa dalla forma stessa del movimento, che non è mai movimento di traslazione, ma soltanto un cambiamento di forma.

Per studiare i mutamenti delle cellule, ho seguìto per tre giorni di seguito le trasformazioni di un gruppo di canalicoli. A vari intervalli ne ho riprodotta l'immagine colla camera lucida ed ottenni tra le altre le Fig. 7, 8, 9, 10. Se la preparazione fu eseguita accuratamente è molto facile tenere in vita un *Hydrophilus* per tre giorni. Gli organi sottoposti alla osservazione non si alterano quando si abbia cura di mantenere sempre la pozzetta piena di soluzione di cloruro di sodio e difenderla dall'essiccamento durante la notte coprendola con una piccola campanella. La fig. 7 rappresenta il gruppo di canalicoli in questione appena fatta la preparazione. Dei tre canalicoli disegnati, uno è allo stato di massima contrazione, uno nello stato medio e l'altro nel dilatato. L'esame della figura serve meglio di qualunque descrizione per dare un' idea delle differenze che si possono osservare nelle condizioni normali. La Fig. 8 rappresenta gli stessi canalicoli 5 ore dopo. In essa si vede che il tubo *a* ha modificato radicalmente l'aspetto delle sue cellule, la sostanza gialla si è raggruppata in una stretta zona attorno al nucleo, le cellule si sono riempite di sfericciuole, le quali, secondo gli autori rappresentano gocciole di secreto, la parte fondamentale del protoplasma si è fatta più granulosa. Gli altri due tubi si mantennero invariati. Dopo 24 ore dacchè la preparazione era stata fatta, riprodussi nella Fig. 9 l'aspetto dei tre tubuli. Come si vede, tutti e tre son passati nello stadio dilatato, nel tubo *a* alcune cellule contengono ancora delle sfere di secreto la sostanza gialla si è raccolta attorno al nucleo. Mettendo nella pozzetta alcune goccie della solita soluzione di verde jodio, il protodlasma cellulare si colora in violetto ed il nucleo si mantiene incoloro. Dopo 48 ore le cellule si presentano come nella Fig. 10.

Vedendo che si son fatte torbide e fortemente granulose provo la reazione col verde jodio, il protoplasma si colora in un violetto grigiastro ed il nucleo prende una tinta leggermente verdognola, per cui sospendo l'osservazione essendo questo uno stadio di morte incipiente.

Tutte queste osservazioni fatte sopra l'organo attaccato all'animale vivente non permettono di adoprare dei forti ingrandimenti. Per veder meglio che cosa si passi nell'interno delle cellule durante questi cambiamenti facevo rapidamente un preparato con un pezzo di tubo esportato all'animale vivo e lo osservavo in una miscela di siero e di cloruro sodico al 0,75 % sostenendo il vetrino copri oggetti con delle striscie di carta spessa in modo da non comprimere l'organo. Necessariamente l'osservazione deve essere fatta in modo rapido, perchè dopo pochi minuti si vede che le cellule rigonfiano, il protoplasma cellulare ed il nucleo di molte cellule escono dal canalicolo in massa conservando tutti i dettagli che si osservano nelle cellule in sito. In questi preparati si possono facilmente vedere a scorrere tra una cellula e l'altra delle piccole goccie di una sostanza jalina giallognola. Esse sono in tutto identiche a quelle più grosse che si vedono scorrere nel lume del canalicolo osservando l'organo in sito con piccolo ingrandimento. Il movimento di queste goccie è lentissimo e fa l'impressione come se fosse impresso da una *vis a* tergo la quale, obligandole a passare per dei canalicoli stretti, fa sì che la loro forma sferica si allunghi. La consistenza di queste goccie è ad un dipresso eguale a quella della zona esterna frangiata del protoplasma cellulare: poichè questo cede anch'esso visibilmente per dar passaggio alla goccia e riprende tosto la primitiva posizione quando essa è passata. Oltre a queste goccie si può spesso incontrare dei punti, in cui la sostanza striata del protoplasma è ricoperta all'esterno da frammenti irregolari, a margini più o meno rotondeggianti, di una sostanza analoga a quella delle goccie. Questi frammenti vanno continuamente ingrossando e prendendo una forma che si avvicina alla sferica.

Engelmann (1) dimostrò che i movimenti delle ghiandole cutanee delle rane descritti da Ascherson dipendono da fibre muscolari liscie della membrana di sostegno delle ghiandole. Queste fibre muscolari però erano già state messe in evidenza da altri e fra cui il prof. Ciaccio. Stricker e Spina (2) confermarono in gran parte le osservazioni di Ascherson ed Engelmann, essi emisero l'ipotesi, che, durante un eccitamento nervoso la ghiandola si svuoti per ricaricarsi al periodo di dilatazione. Questo modo di vedere

---

(1) Loco citato.

(2 WIENER, *Sitzungsberichte*, 1879, vol. 80, parte III, pag. 95.

non fu condiviso da Heidenhain (1) il quale lo confutò con buoni argomenti. Biedermann (2) poi mise in dubbio l'attività dei movimenti delle cellule ghiandolari. Drasch (3), osservando direttamente le ghiandole della membrana nittitante nelle rane viventi, potè dimostrare con misure esatte che nelle cellule vi sono dei movimenti passivi e dei movimenti attivi, e che questi movimenti sono sotto la dipendenza di speciali fibre nervose. Schindler (4); studiando sotto il punto di vista anatomico e fisiologico i canalicoli malpighiani di tutte le famiglie di insetti, trovò che, quantunque in molte famiglie i tubi malpighiani possano essere forniti di fibre muscolari ed elastiche, non si potè mai osservare alcun movimento. Soggiunge però che nei coleotteri mancano le fibre muscolari, e non dice in quali condizioni abbia fatto le sue osservazioni.

Durante i movimenti descritti quei granuli che si trovano nell'interno dei tubi, e che secondo gli autori rappresentano i prodotti di secrezione delle cellule, sono spinti in una determinata direzione. Siccome però molto spesso i movimenti delle cellule e dei tubi sono molto irregolari, ne avviene che invece di seguire costantemente una determinata direzione procedono a sbalzi e non di rado ritornano indietro con movimento di andirivieni, però, siccome predomina il movimento in un determinato senso, dopo una lunga serie di contrazioni finiscono per essersi spostati di un tratto più o meno grande. Nelle osservazioni fatte durante la seconda metà dello scorso ottobre e nel mese di novembre, non potei mai osservare dei movimenti spontanei. Dirò in seguito quale ne sia la causa probabile.

Azione del solfoindigotato di sodio sui canalicoli malpighiani.

Quando si lascia cadere una goccia di una soluzione concentrata di solfoindigotato di sodio nella soluzione fisiologica di cloruro di sodio dove stanno distesi i tubi malpighiani, il campo

---

(1) HERMANN'S, *Handbuch der Physiologie*. vol. 5, pag. 414.
(2) WIENER, *Sitzungsberichte*, 1886, vol. 94, parte III.
(3) Loco citato.
(4) *Zeitscrift f. Wissenschaftliche Zoologie Kölliker und Siebold*, vol. 30, pag. 587.

del microscopio nei primi istanti si colora intensamente in azzurro, poi la colorazione va man mano scomparendo, senza che si possa vedere traccia di colorazione nelle cellule. I tubi che prima si contraevano stanno immobili e le cellule passano nello stadio della massima dilatazione. Dopo un lasso di tempo che può oscillare da due minuti ad un'ora si ripristina il movimento, specialmente se si lava il preparato con la solita soluzione di cloruro di sodio, e nell'interno dei tubi si vedono comparire dei grossi granuli, irregolarmente sferici o poliedrici intensamente colorati, in azzurro. Essi seguono il movimento che avevano i granuli di cui sopra si è parlato, prima dell' aggiunta del solfoindigotato di sodio. Non ho mai potuto stabilire che cosa avvenga del solfoindigotato dal momento in cui scompare la colorazione del liquido contenuto nella pozzetta, a quello in cui compaiono queste granulazioni colorate nell'interno dei canalicoli. Quando la quantità di solfoindigotato aggiunta è alquanto considerevole, la colorazione viene bensì distrutta completamente, ma la quantità di granuli azzurri che compaiono nel lume del canalicolo diventa così grande, che essi formano delle lunghe colonne difficilmente spostate dalla debole forza di contrazione. Allora si formano come dei trombi i quali si localizzano di preferenza in quei punti, dove i tubi sono in riposo. In questi casi dopo un intervallo di due o tre ore il nucleo delle cellule comincia ad essere limitato da contorni netti e le cellule si alterano. Alcune volte però il fenomeno non segue questo decorso, e questo l'osservai specialmente negli idrofili digiuni da lungo tempo. In questi casi l'aggiunta di solfoindigotato non arresta i movimenti, anzi pare che li acceleri, le cellule si modificano, scompare l'area chiara nucleare la quale viene occupata dalle granulazioni gialle, e tutto ciò senza che le cellule prendano gli altri caratteri dello stadio contratto.

Schindler aveva ripetuto sopra il grillotalpa le esperienze di Heidenhain col solfoindigotato ed aveva trovato che le cellule si colorano intensamente tanto nel protoplasma quanto nel nucleo. Dal modo, con cui aveva veduto scomparire la colorazione dagli elementi epiteliari osservando i tubi malpighiani a diversi intervalli dall'injezione, si era creduto autorizzato di stabilire una dottrina speciale del processo di secrezione. Egli dice che le cellule sono solamente permeabili secondo una direzione dall' esterno all'interno, per cui le sostanze sono assorbite dalla parte della cellula

che è in contatto colla parete del canalicolo, questa le cede al nucleo il quale le lascia passare alla parte rivolta verso il lume del tubo.

Nelle ghiandole della membrana nittitante delle rane Drasch osservò che in seguito all'injezione di solfoindigotato nel sangue compare quasi immediatamente un precipitato granuloso di solfo-indigotato nel nucleo, quindi si colora il protoplasma cellulare, e dopo un breve tempo la colorazione scompare.

Per quanto io mi sia sforzato di osservare attentamente e senza interruzione non sono mai riuscito a vedere alcuna traccia di colorazione nell'interno delle cellule, nè mi fu dato di stabilire quale via seguisse il solfo indigotato per passare dal liquido ambiente nell'interno del canalicolo, dove lo ritrovai costantemente. Il trovarsi esso imprigionato in ammassi di forma più o meno regolarmente sferica, di consistenza solida molto simile ai granuli che si trovano normalmente nell'interno del tubo, costringe ad ammettere che esso venga ridotto in quello stato dall'attività propria delle cellule. Senza di ciò non si arriverebbe neppure a capire, come esso passi tutto nell'interno dei tubi e non ne passi solo quel tanto necessario per stabilire l'equilibrio secondo la legge della diffusione, e come una volta che è passato tutto nell'interno, non segua la via opposta per diffondersi nel liquido ambiente. Non credo che le mie esperienze fossero fatte in condizioni troppo lontane dalle normali, perchè siccome gli insetti, all'infuori del grande vaso dorsale, hanno semplicemente una circolazione lacunare, anche nelle condizioni normali le cellule ghiandolari devono prendere i materiali per il loro lavoro dal liquido che le circonda. Tenuto conto della rapidità relativamente grande, con cui le cellule epiteliari imprigionano il solfoindigotato scolorandolo, e lo cacciano nell'interno del tubo da loro limitato, non mi posso spiegare il fatto constatato da Schindler, il quale trovò le cellule epiteliari ancora colorate 15 ore dopo fatta l'injezione di solfoindigotato, se non ammettendo che la quantità injettata fosse straordinariamente grande e quindi avesse alterato le cellule. Fui confermato in questa opinione dal fatto, che egli osservò non solo colorazione del protoplasma, ma anche del nucleo, il quale non si colora se non quando la cellula ha sofferto in qualche modo.

Le proprietà chimiche del solfoindigotato di soda sono le sole, che riescano a spiegare come possa avvenire il suo passaggio

attraverso alla cellula, senza lasciar traccie della via seguìta. È noto che l'acido solfoindigotico ha la proprietà di venir assorbito rapidamente dalle sostanze animali, anzi, su questo si fonda il processo della sua preparazione. Si sa pure che gli agenti riduttori e la fermentazione non solo, ma anche il glucosio in presenza di un alcali possono trasformare l'azzurro d'indaco nell'indaco solubile bianco, e che questo riacquista il primitivo colore quando venga ossidato. Date le condizioni delle mie esperienze si deve ammettere, che nelle cellule epiteliari dei tubi malpighiani avvenga anche un processo riduttore, il quale accompagna l'assorbimento e l'eliminazione del sale, e che questo venga poi ossidato nell'interno del tubo, dove soltanto ci è permesso di poterlo constatare otticamente. Nelle cellule si trovano tutte le condizioni perchè ciò possa avvenire, si è visto che esse hanno reazione distintamente alcalina, si sa che il glucosio tanto allo stato libero quanto legato nella molecola complessa dell'albumina si si trova pressochè in tutti i tessuti animali, mi pare quindi probabile che questa sia realmente la ragione per cui le cellule epiteliari si comportano nel modo descritto.

Già Erlich (1) nelle sue ricerche colla injezione di sostanze coloranti sensibili agli agenti riduttori aveva osservato, che il fegato ed i reni, malgrado la loro grande potenza riduttrice, producono un secreto colorato, mantenendosi essi stessi incolori.

Influenza esercitata dagli agenti chimici e fisici sopra i tubi malpighiani.

Ho già accennato che nelle osservazioni fatte durante la seconda metà del mese di ottobre, e nel mese di novembre non riuscii mai a percepire alcun movimento nei canalicoli malpighiani. In quelle osservazioni si vedevano bensì tutte le fasi descritte, ma non era dato osservare il passaggio dall'una all'altra anche prolungando l'osservazione per parecchie ore di seguito. I granuli che normalmente scorrono nell'interno dei canalicoli erano

---

(1) Erlich, *Das Sauerstoff Bedürfniss des Organismus*, Berlin, 1885, pag. 156.

più scarsi e perfettamente immobili. Ricercando quale ne potesse essere la causa non tardai ad accorgermi che risiedeva nella bassa temperatura. Accennerò alcuni dei modi con cui potei convincermi di questo fatto e come potei riprodurre a volontà il movimento. Osservando durante la sera un preparato di *Hydrophilus* i cui tubi erano rimasti immobili per tutto il giorno, vidi comparire dei movimenti, e constatai che i raggi calorifici della lampada, concentrati dalla sfera a solfato di rame ammoniacale, dallo specchio e dall'apparecchio di Abbé avevano rialzato alquanto la temperatura della pozzetta. Bastò questo leggero aumento per ridestare i movimenti nei canalicoli assopiti, difatti, sospendendo per alcun tempo l'azione del calore in modo che il liquido si raffreddasse, il movimento scomparve e fu necessario che il calore agisse di nuovo per un certo tempo affinchè ricomparisse. Allora modificai alquanto la costruzione della pozzetta a cloruro di sodio circondandola da uno spazio vuoto, entro il quale facevo circolare a volontà dell'acqua fredda o dell'acqua riscaldata a $20^0, -25^0$ *C*. Con questo apparecchio potevo a piacimento far comparire o scomparire i movimenti. Notai che in genere quando la temperatura discende verso gli $8^0 - 10^0$ *C*. i movimenti sono lentissimi e limitati, o sono scomparsi del tutto. A questa temperatura anche gli idrofili si mostrano meno vivaci e non mangiano più. Però prolungando l'osservazione per parecchi giorni si vede che i canalicoli vanno modificandosi in modo graduale e continuo passando dallo stato contratto al rilassato e viceversa; e dopo un certo intervallo di tempo possono essere così mutati da diventare irreconoscibili.

Ho cercato se l'elettricità esercitasse qualche azione sopra i canalicoli. Mi servivo di correnti indotte o continue, alle quali facevo attraversare la pozzetta piena di soluzione fisiologica di cloruro di sodio dove si trovavano i tubuli, però tutte le prove riuscirono negative.

Fra gli agenti chimici ho provato l'atropina, la policarpina l'urea, il curare e le soluzioni concentrate di cloruro di sodio. Riassumerò brevemente i risultati ottenuti. Per l'azione di alcune goccie di una soluzione satura di cloruro di sodio fatte cadere nella pozzetta si arresta immediatamente ogni movimento, i tubi prendono le diverse posizioni che possono avere nello stato di riposo, i cristallini gialli si distribuiscono regolarmente per tutta la cellula, molto marcati appaiono i contorni del nucleo e della

cellula. Può ricomparire lo stato normale in alcuni tubi lavando con abbondante acqua, però la maggior parte dei canalicoli persiste alterata.

Per l'azione del cloridrato di pilocarpina in soluzione all'1 $^0/_0$ si arrestano immediatamente i movimenti in tutti i tubi, i quali prendono la posizione di massima dilatazione. Dopo 20 minuti od un'ora ricomincia il movimento, che ritorna normale dopo due ore.

Coll'aggiunta di solfato di atropina all'1 $^0/_0$ cessa il movimento ma i tubi si presentano per lo più contratti.

Il curare al 0,5 $^0/_0$ fa cessare ogni movimento, le cellule ed i tubi si dilatano. Si vede dalla fig. 10 che la loro colorazione diventa pallida, i cristalli gialli si raccolgono in un punto della cellula aderente al nucleo, senza circondarlo in tutta la sua periferia come avviene nello stato normale. Questa specie di paralisi dura circa dieci minuti e dopo ricompare l'aspetto normale.

Si ripetono ad un dipresso gli stessi fenomeni per azione dell'urea al 2 $^0/_0$. Tanto nell'un caso quanto nell'altro l'area nucleare diventa più chiara. L'azione dell'urea è più duratura, dopo lo stato, direi quasi di rilassatezza, ha luogo uno stato di contrazione esagerata, la quale dura una ventina di minuti, in seguito ai quali ricompare lo stato normale. Nei primi momenti dopo l'aggiunta dell'urea si nota un'esagerazione nel movimento dei granuli che scorrono nell'interno dei tubi. L'urea ha un azione molto potente per cui difficilmente le cellule resistono ad una nuova aggiunta di questa sostanza, ma per lo più si fanno torbide ed il loro nucleo diventa colorabile col verde jodio.

Conclusioni.

1° Il protoplasma delle cellule viventi si colora in violetto porpora col verde jodio. Dopo morte il nucleo di queste cellule ha reazione acida, ed il protoplasma si colora in grigio azzurrastro.

2° Nel protoplasma cellulare si trovano dei granuli di struttura complessa i quali hanno potere di fissare il bleu di metilene e di ridurre i sali d'oro.

3° I tubi malpighiani eseguiscono dei movimenti senza che si possa constatare la presenza di elementi contrattili. Questi movimenti sono arrestati dalle temperature basse, non sono influenzati dall'elettricità e possono essere sospesi da vari agenti chimici.

4° La parte periferica delle cellule ha una struttura striata molto delicata che si altera rapidamente.

5° Le cellule epiteliari dei tubi malpighiani eseguiscono anche esse dei movimenti indipendenti da quelli dei canalicoli. Tra le parti della cellula che più si modificano durante questi movimenti vanno messi in ordine decrescente la parte periferica l'area nucleare e la parte intermedia.

6° La sostanza, che fornisce il colore particolare alle cellule, vi si trova sotto forma di cristalli, che si sciolgono nell'alcool dandogli una fluorescenza verde.

7° Il solfoindigotato di sodio viene ridotto dalle cellule epiteliari, per cui dentro di esse si trova allo stato di indaco bianco. Riprende il primitivo colore quando viene secreto.

8° Durante la funzione si formano nell'interno delle cellule delle sfericciuole di una sostanza solida, la quale viene poi eliminata dalla cellula e ne costituisce il secreto.

9° Non tutte le cellule funzionano contemporaneamente

10° La struttura delle cellule varia sotto l'azione di sostanze estranee che debbono venire eliminate.

Laboratorio di Fisiologia della R. Università.
Torino, Giugno 1890.

Fig. 1

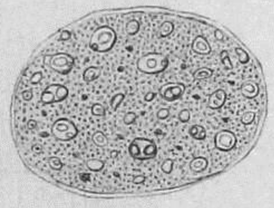


Fig. 2

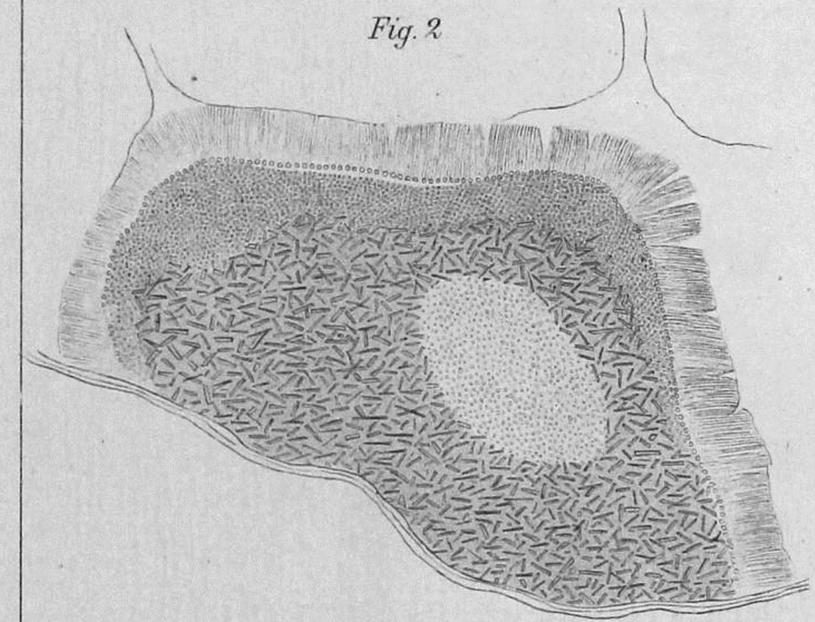


Fig. 3

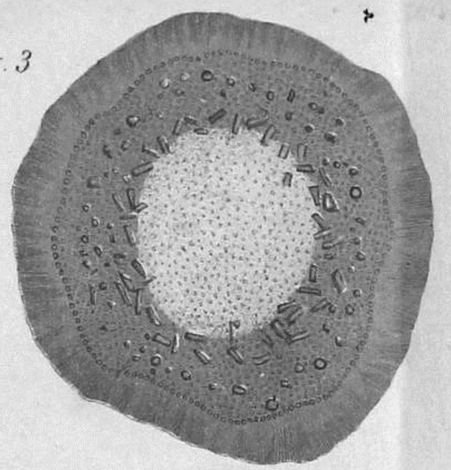


Fig. 4

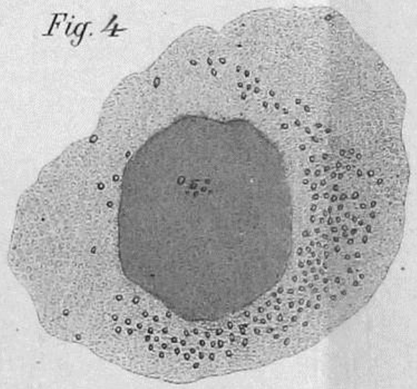


Fig. 5

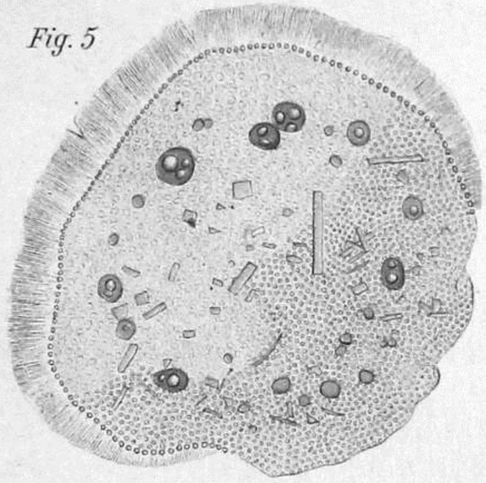


Fig. 6

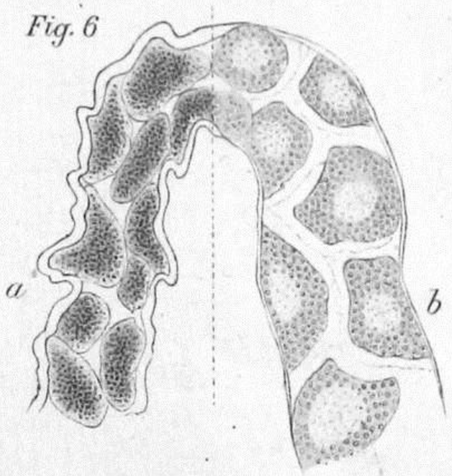


Fig. 11

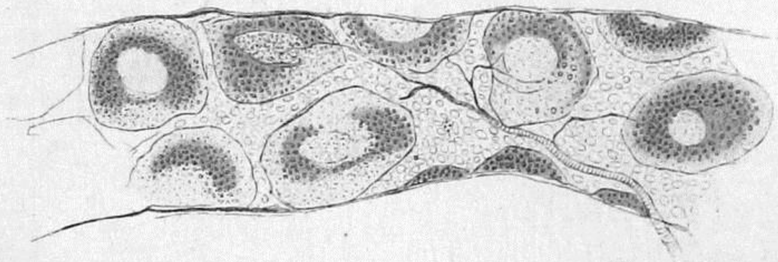


Fig. 7

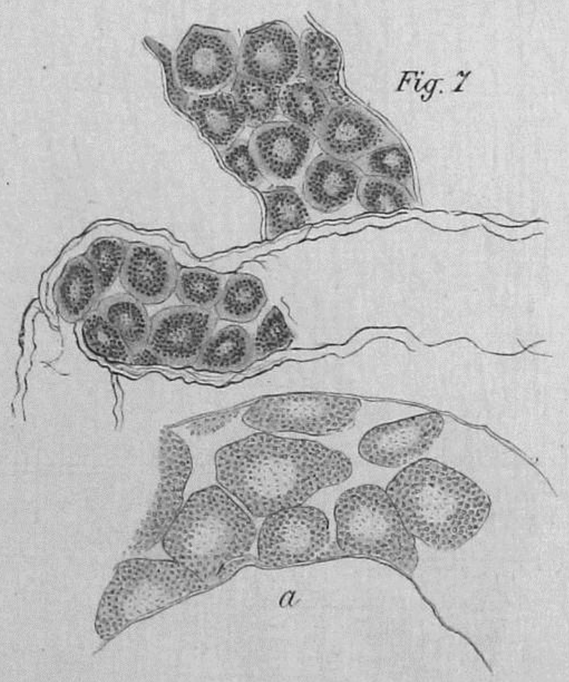


Fig. 8

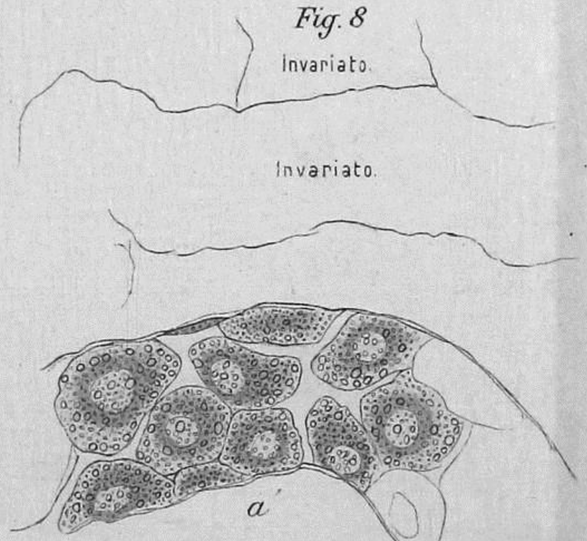


Fig. 9

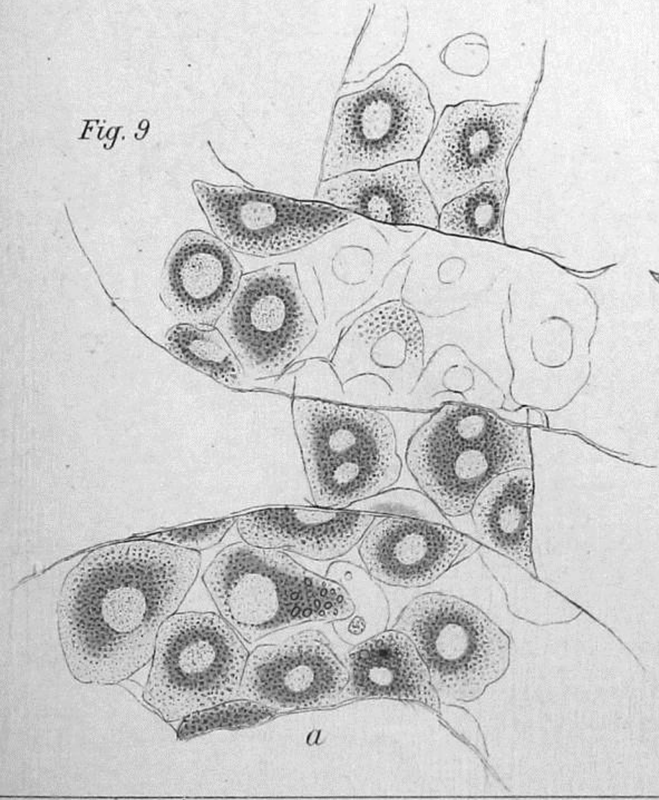
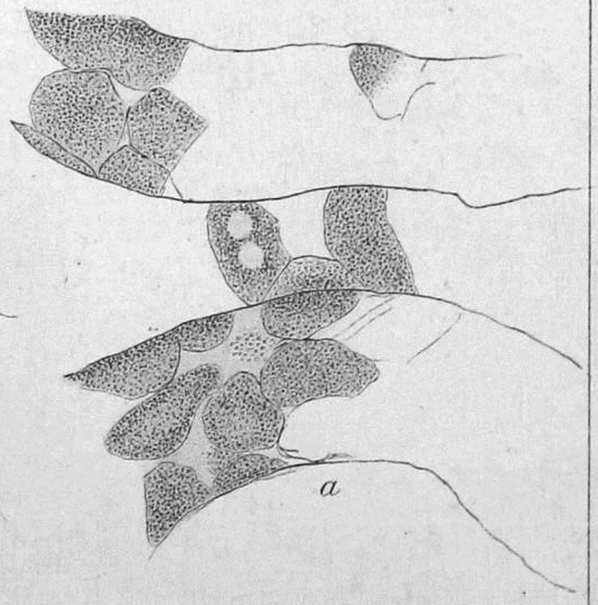


Fig. 10



Grandis disegnò dal vero.

Torino, Lit. Salussolia.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

FIG. 1. Nucleo ovale della parete del canalicolo con grosse granulazioni di struttura complicata $^{1}/_{12}$ Leitz. Camera lucida.

» 2. Cellula epiteliare dei canalicoli malpighiani $^{I}/_{12}$ Leitz.

» 3. Cellula epiteliare viva trattata con verde jodio 8* Koritska.

» 4. Cellula epiteliare morta trattata con verde jodio.

» 5. Cellula epiteliare dei canalicoli malpighiani di un *Hydrophilus* cui era stato injettato del bleu di metilene. $^{1}/_{12}$ immer. omog. Leitz.

» 6. Ansa di un canalicolo malpighiano contraentesi. *A* stadio contratto. *B* stadio dilatato. 3 Leitz. camera lucida.

» 7. Gruppo di canalicoli malpighiani appena fatta la preparazione. 3 Leitz camera lucida.

» 8. Lo stesso dopo 5 ore.
» 9. Lo stesso dopo 24 ore.
» 10. Lo stesso dopo 48 ore.
} 3 Leitz camera lucida.

» 11. Canalicolo sotto l'azione del curare e dell'urea.